

Japanese Publication for Patent No. 21519/1973

(Shou 48-21519)

The following is a partial English translation of exemplary portions of non-English language information that may be relevant to the issue of patentability of the claims of the present application.

The present invention provides an economical and industrially advantageous method of producing the coenzyme Q. More specifically, the present invention provides a method of producing the coenzyme Q, the method comprising incubating *Rhodopseudomonas capsulatus* aerobically in a medium whose carbon source is hydrocarbon, which is available in a large quantity at low cost, producing the coenzyme Q in cells of *Rhodopseudomonas capsulatus*, accumulating the coenzyme Q in the cells to a significant amount, and extracting the coenzyme Q with an organic solvent from the cells.

⑤ Int. Cl.
C 12 d 13/00
C 07 c

⑥ 日本分類
36(2) D 32
36(2) C 04
16 C 44

⑦ 日本国特許庁

⑧ 特許出願公告
昭48-21519

特許公報

⑨ 公告 昭和48年(1973)6月29日

発明の数 1

(全4頁)

I

⑩ コエンチームQの製造法

⑪ 特 願 昭45-107969
⑫ 出 願 昭45(1970)12月4日
⑬ 発明者 持田晃一
寝屋川市東香里園町8の10
同 大崎孝雄
京都府船井郡丹波町大字水戸小字
六呂5の1
同 小林達治
京都市左京区浄土寺真如町137
同 木村隆一
京都市北区大宮上岸町66
⑭ 出願人 財団法人生産開発科学研究所
京都市左京区下鴨森本町15

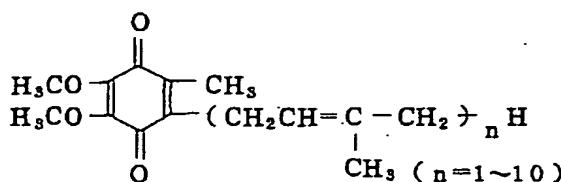
図面の簡単な説明

第1図は本発明方法により得たコエンチームQ₁₀の紫外線吸収スペクトルを示すものであり、第2図は同じ赤外部吸収スペクトルを示すものである。

発明の詳細な説明

本発明は微生物を利用してコエンチームQを製造する方法に関するものである。

コエンチームQ(Coenzyme Q)は生体内における酸化的リン酸化電子伝達系に極めて重要な役割をしているキノン類であつて、下記の一般式で示される公知化合物であり、キノン核の6位にイソブレン側鎖をもつ2・3-ジメトキシ-5-メチル-1・4-ベンゾキノン群の総称で、イソブレン単位の数によりコエンチームQ₁～Q₁₀が存在する。



2

天然におけるコエンチームQの存在は多くの動植物や微生物に知られているが必ずしも普遍的でなく、また含有量も極めて微量であり、その抽出に当つての収率も極めて低いものであり、また合成法による製造も試みられているが複雑な工程と操作を要する為に製造コストが極めて高くつき、企業的に採算のとれるものでは未だ出現していない。従つて、これまで安価に多量のコエンチームQを生産することは困難であつた。

10 本発明は、上記コエンチームQを経済的かつ工業的に有利に製造する方法を提供せんとするものであり、詳しくは大量かつ安価に得られる炭化水素を炭素源とする培地にロドシュウモナス・キアブスレータス(*Rhodopseudomonas capsulatus*)
15 を好気的条件下に培養し、当該菌体内に著量のコエンチームQを生成蓄積せしめ、しかる後有機溶媒によつてこれを抽出分離することによりコエンチームQを得る方法である。

先ず本発明方法に用いるロドシュードモナス・キアブスレータスについてその性質の概要及び菌学的性質について述べる。すなわちロドシュードモナス・キアブスレータスはアチオロダーシエ(*A thiorhodaceae*、紅色無硫黃細菌)科に属し、本発明者等の研究によれば熱帯、亜熱帯のほとんどの溜水状態の場所、例えば水田、溝、下水、河川、湖、海、温泉などに生存している。

(a) 形態的特徴

一本の鞭毛を有し、極めて運動性に富む、普通は短桿状菌(幅0.5μ×長さ1.0μ)であるが、
30 培養液の種類、培養期間によつては長桿状菌(幅0.5～0.7μ×最さ6.0μ)のものも出てくる。即ち多形現象を示す。

(b) 生育条件

各種培地における生育状態(嫌気的照明条件下)

35 肉汁	+
ペプトン水	++
馬鈴薯培地	-

3

チオサルフェート(Thiosulfate)	-
マラニン	+
ロイジン	-
アスパラギン	+
アスパラギン酸	-
グルタミン酸	+
酒石酸	-
クエン酸	-
グルタル酸	+
酢酸	+
プロピオン酸	++
乳酸	++
コハク酸	+
リンゴ酸	+
酪酸	++
クロトン酸	+
ビルビン酸	++
エタノール	-
マンニトール(Mannitol)	-
ソルビトール	-
ブドウ糖	+
マンノース	-
果糖	+
グリセロール	-

(註) いずれも基質について0.2%濃度
使用

+++	生育良好
+	生育可能
-	生育不可能

(c) 生理的性質

(1) 最適生育条件

pH 7.2、温度 27°C、嫌気的照明
(10000 lux)

(2) 生育しうる条件

pH 6.0~8.5、温度 23~39°C、好気
~嫌気、暗黒条件~照明条件

(3) グラム染色法

陰性

(4) 抗酸性

あり

(5) インドールの生成

なし

(6) 硫化水素の生成

なし

4

(7) 窒素ガスを固定する能力

あり

(8) カタラーゼの生成

あり

5 (9) ゼラチンの液化

なし

(10) 濃粉の加水分解

なし

10 (11) 還元剤メチレンブルー、還元型メチル(又
はベンジル)バイオロジエン色素の酸化能力
あり

12 (12) ビオチン、チアミン、ニコチン酸を生長因子として要求する。

以上の菌学的性質をバージェイ・マニュアル・

15 オブ・ディターミネイティブ・バクテリオロジー
第7版の記載と対照するとアチオロダーシエ科の
ロドシュードモナス属キヤブスレータス種と同定
される。

次に本発明方法においては上記の菌株を炭化水

20 素類を炭素源とし、その他該菌の生育に必要な栄
養素を含有する培地で好気条件下に培養する。こ
の時培地の形態は一般に液体培地によるのが有利
である。液体培地による培養にあつては振とう培
養、搅拌培養などのいずれで行なつてもよいが、
25 いわゆる深部通気培養によるのが工業的にもつと
も有利である。

培地は炭素源として炭化水素類を含有させたも
のが使用される。炭化水素類としては、たとえば
ヘキサン、ドデカン、テトラデカン、オクタデカ
30 ン、n-パラフィン混合物、ケロシン、灯油などの
脂肪族炭化水素類が用いられる。これらの炭化
水素類はほとんど水に溶解しないから液体培地に
添加するに際しては培地水溶液と激しく搅拌して
細密なけんだけ液としたり、適當なけんだけ助剤、
35 溶解助剤を添加するのがよい。

窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類な
どの無機窒素化合物、コーンスチーブリカ、ペ
ブトン、カゼイン、酵母エキスなどの有機窒素含
有物などが用いられる。その他カリウム塩、ナト
リウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、リン
酸塩、硫酸塩などの無機塩及びニュチニ酸、チア
ミン、ビオチンなどのビタミン類を生長因子とし
て極微量添加する。

上記の培地に前記したロドシュードモナス・キ

ヤブスレータスを接種して初発pH 7付近、27～30℃で72～120時間振とう培養又は通気搅拌培養などの好気条件下に培養すると培養の経過と共にコエンチームQが菌体内に生成蓄積される。

上述の如くして大量に培養したロドシユードモナス・キヤブスレータスからコエンチームQを抽出するには菌体を連続式遠心分離機(例えはシャープレス・タイプのもの)を用いて集菌し、水分約80%の菌体濃縮物(湿菌)とした後、これをいつたん抗酸化剤の存在下でケン化後、又は直後に、有機溶媒例えはクロロホルム、エーテル、石油エーテル、ヘキサン、シクロヘキサン、イソオクタンなどによつて処理すれば目的物コエンチームQは抽出され、有機溶媒を除去すれば黄色を呈した粗製コエンチームQを得ることができる。またメタノール、エタノールなどの極性溶媒で抽出した後、さらに上記無極性溶媒で再抽出を行なえば收率を上げることができる。なお、抽出処理における有機溶媒の量、搅拌時間等は溶媒の種類、温度などにより、適宜選択されることは当然である。

このようにして得られた粗製コエンチームQはアルミナ、ケイ酸、ケイ酸マグネシウム、ケイ酸アルミニウム等の吸着剤を用いたカラムクロマトグラフィーあるいは薄層クロマトグラフィーなどによつて精製すれば赤外吸収スペクトル、紫外吸収スペクトルなどによりコエンチームQの標品と一致する精製コエンチームQを得ることができる。

以上の如き構成の本発明方法によれば、安価な培養基を用いて、容易に、收率よく多量のコエンチームQを製造することができる。次に本発明の詳細を実施例により説明する。

実施例 1

n-テトラデカン20ml、酢酸アンモニウム5g、リン酸第一カリウム1g、硫酸マグネシウム0.2g、塩化ナトリウム0.1g、塩化カルシウム0.05g、炭酸水素ナトリウム0.5g、酵母エキス0.5gおよび水道水1lからなる培地(pH 7.0に調整)を10l容のジャー・フアーメンターハイ5l入れ、これに上記培地中n-テトラデカン20mlをプロピオン酸ナトリウム5.0g、酢酸アンモニウム5gを硫酸アンモニウム0.5gにそれぞれ変えた培地でロドシユードモナス・キヤブ

スレータス菌株(微工研菌寄第879号)をあらかじめ27℃、72時間5000luxの照明下で嫌気的に培養して得た前培養液1lを接種し30℃、500r.p.m. 400%/分通気で120時間培養した。培養終了後この培養液より常法に従い遠心分離して菌体を取り出し、12gの湿菌(水分80%含有)が得られた。ここに得られた湿菌を凍結、融解し、メタノール:クロロホルム(1:1)混液で抽出を繰り返した後、水を加えて振とうし、水層の部分を除去して、クロロホルム層は濃縮した。次いで濃縮物はヘブタンに溶解し、ケイ酸を充填したカラムに吸着させた後ヘブタン:クロロホルム(1:1)混液で溶出し、コエンチームQの画分を得た。本画分を減圧下で蒸発乾固し、エタノールより再結して黄色のコエンチームQ 5.2mgを得た。そしてこのものは薄層クロマトグラフィー、紫外外部吸収スペクトル、赤外部吸収スペクトルからコエンチームQ₁₀であることを確めた。なお、收量は乾燥菌体1kg当り2.1gであった。

実施例 2

炭化水素としてn-テトラデカンをユーバラフィン混合物(沸点65～255℃)に代えて、実施例1と全く同様の方法によりロドシユードモナス・キヤブスレータス(微工研菌寄第879号)を培養し、培地1l当り1.6gの湿菌(水分80%含有)を得た。そして菌体を実施例1と同様に処理したところ湿菌1g当り0.36mgのコエンチームQ₁₀が黄色板状結晶で得られた。

なお收量は乾燥菌体1kg当り1.8gに相当した。

実施例 3

炭化水素としてケロシンを用い、実施例1と同様の方法によりロドシユードモナス・キヤブスレータス(微工研菌寄第879号)を培養し、培地1l当り1.4gの湿菌(水分80%含有)を得た。この菌体を実施例1と同様の方法で処理を行なつたところ、湿菌1g当り0.3mgのコエンチームQ₁₀が得られた。これは乾燥菌体1kg当り1.5gに相当する。

⑤特許請求の範囲

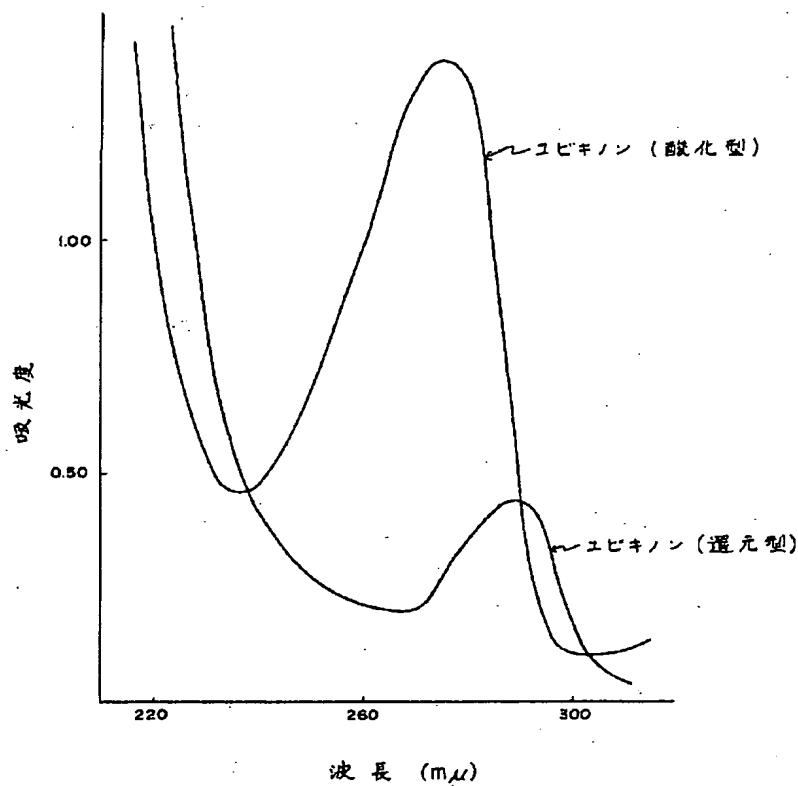
1 炭素源として炭化水素を含有する栄養培地に、ロドシユードモナス・キヤブスレータス(*Rhodopseudomonas capsulatus*)を培養して菌体にコエンチームQ(Coenzyme Q)を蓄積させ、これ

7

8

を単離することを特徴とするコエンチームQの製造法。

ガ 1 図



ガ 2 図

